

⑯ BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENTAMT

⑯ Offenlegungsschrift

⑯ DE 3530780 A1

⑯ Int. Cl. 4:

A 61 K 31/41

⑯ Aktenzeichen: P 35 30 780.3
⑯ Anmeldetag: 28. 8. 85
⑯ Offenlegungstag: 3. 7. 86

Behördeneigentum

⑯ Unionspriorität: ⑯ ⑯ ⑯

24.12.84 JP 270939/84 29.03.85 JP 63320/85

⑯ Anmelder:

Wakamoto Pharmaceutical Co., Ltd., Tokio/Tokyo,
JP

⑯ Vertreter:

Vossius, V., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Vossius, D.,
Dipl.-Chem.; Tauchner, P., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.;
Heunemann, D., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.; Rauh, P.,
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 8000 München

⑯ Erfinder:

Abe, Tooru, Sagamihara, Kanagawa, JP;
Yanagihara, Yukiyoshi, Machida, Tokio/Tokyo, JP;
Shida, Takao, Sagamihara, Kanagawa, JP; Kohno,
Shigekatsu, Ohtsu, Shiga, JP; Ohata, Katsuya, Uji,
Kyoto, JP; Ogasawara, Yoshiaki, Odawara,
Kanagawa, JP; Kageyama, Shinji, Kanagawa, JP;
Oguma, Touru; Tsuriya, Yoshihiro, Hatano,
Kanagawa, JP; Kuroda, Toshio, Sagamihara,
Kanagawa, JP; Hashimoto, Terumasa, Kawasaki,
Kanagawa, JP

⑯ Verwendung von 5-(3-n-Butyloxylaminophenyl)-tetrazol

5-(3-n-Butyloxylaminophenyl)-tetrazol wird aufgrund seiner Wirkung als Inhibitor der SRS-A-Freisetzung als Wirkstoff für ein Asthmolytikum verwendet. Beschrieben ist ferner ein Arzneimittel, das durch Mischen des Tetrazols mit einem spezifischen Dispergiermittel wie Polysorbat-80 zusammen mit einem nicht-wässrigen Lösungsmittel konfektioniert wird und ein hohes Auflösungsvermögen und gute Bioverfügbarkeit aufweist.

DE 3530780 A1

DE 3530780 A1

3530780

SIEBERTSTRASSE 4 · 8000 MÜNCHEN 86 · PHONE: (089) 474075
CABLE: BENZOLPATENT MÜNCHEN · TELEX 5-29 453 VOPAT D

28. AUG. 1985

5 u.Z.: T 924 (DV/kä)
Case: OP 85 167

WAKAMOTO PHARMACEUTICAL CO., LTD.
Tokyo, Japan

10 10 " Verwendung von 5-(3-n-Butyloxalylaminophenyl)-tetrazol "

P a t e n t a n s p r ü c h e

- 15 1. Verwendung von 5-(3-n-Butyloxalylaminophenyl)-tetra-
zol als Inhibitor der SRS-A-Freisetzung.
- 20 2. Pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung von
Asthma, gekennzeichnet durch
a) einen Gehalt an 5-(3-n-Butyloxalylaminophenyl)-
tetrazol in einer zur Hemmung der SRS-A-Frei-
setzung wirksamen Menge und
b) mindestens einem Bestandteil aus der Gruppe
Polysorbat-80, Polyvinylpyrrolidon, mit Polyoxy-
äthylen gehärtetes Ricinusöl, Polyäthylenglykol,
25 Hydroxymethylcellulose, Hydroxypropylcellulose
und Hydroxypropylmethylecellulose.
- 30 3. Verfahren zur pharmazeutischen Zubereitung des
Asthmamittels nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet,
daß man entweder
a) 5-(3-n-Butyloxalylaminophenyl)-tetrazol in einer zur
Hemmung der SRS-A-Freisetzung wirksamen
Menge mit mindestens einem Dispergiermittel aus
der Gruppe Polysorbat-80, Polyvinylpyrrolidon,
35 mit Polyoxyäthylen gehärtetes Ricinusöl, Polyäthy-

- 2 -

1 lenglykol, Hydroxymethylcellulose, Hydroxypropyl-
cellulose und Hydroxypropylmethylcellulose zusam-
men mit einem nicht-wässrigen Lösungsmittel gleich-
mäßig vermischt und anschließend das nicht-wässrige
5 Lösungsmittel aus dem Gemisch entfernt, oder

- b) den Wirkstoff in flüssigem Polyäthylenglykol auf-
löst und damit ein den Wirkstoff enthaltendes Poly-
äthylenglykol erhält.

10

15

20

25

30

35

1

5 Asthma ist eine Krankheit, die durch paroxymale Dyspnoe und Stridor, verursacht durch eine Stenose der Luftwege, gekennzeichnet ist.

10 Typische Ursachen der Stenose der Luftwege sind eine Konstriktion der glatten Muskulatur der Luftwege, die Bildung von Ödemen in der Mundschleimhaut, vermehrtes Sputum und die Bildung von Mukozelen in den Luftwegen; von diesen Ursachen ist die Konstriktion der glatten Muskulatur der Luftwege die wichtigste.

15 Die Luftwege eines Asthmapatienten neigen allgemein zur Produktion von IgE-Antikörpern gegen viele Antigene einschließlich inhalierter Allergen. Aus diesem Grunde enthält der Körper von Asthmapatienten eine große Menge von IgE-Antikörpern. Wenn sie also Antigene, wie z.B. Pollen oder andere Allergene, einatmen, so wird eine Antigen-Antikörper-Reaktion auf der Oberfläche der Mastzellen ausgelöst, die in reichem Maße in der Submukosa der Luftwege vorhanden sind. Histamin und SRS-A (slow reacting substance of anaphylaxis), deren Freisetzung durch die Antigen-Antikörper-Reaktion ausgelöst wird, verursachen Asthmasymptome, zu denen auch die Konstriktion der glatten Muskulatur gehört (Progress in Medicine, Bd. 3, (1983), S. 655 bis 666).

20 30 Die durch Histamin verursachte Verkrampfung der glatten Bronchialmuskulatur ist stark und äußerst schmerhaft, ein ernster Anfall ist aber innerhalb verhältnismäßig kurzer Zeit vorbei (Allergy, Bd. 7 (1958), S. 93 - 104).

35 Im Gegensatz dazu erfolgt die Konstriktion der glatten Bronchialmuskulatur durch SRS-A langsam, hält jedoch

1 lange an, so daß der Asthmapatient unter starken Schmerzen
 leidet. Die Entwicklung eines Wirkstoffes, der wirksam
 die Freisetzung von SRS-A inhibiert, war daher wünschens-
 wert (Progress in Medicine, Bd. 3 (1983), S. 655 bis 666).

5

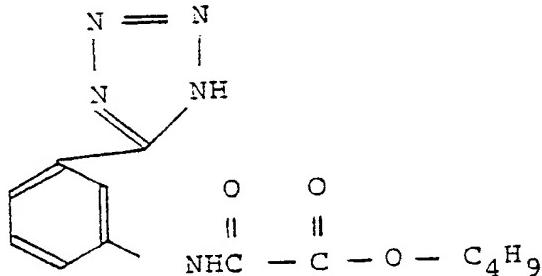
SRS-A wird aus Mastzellen oder dergleichen durch eine
 Antigen-Antikörper-Reaktion freigesetzt, an der ein IgE-
 Antikörper beteiligt ist. Im Gegensatz zum Histamin, das
 einem präformierten Mediator zuzuordnen ist, wird

10 SRS-A durch die Stimulie-

rung der Reaktion synthetisiert und gehört zu einem neu
 erzeugten Mediator, der im wesentlichen aus den Leuko-
 trienen C₄, D₄, E₄ (LTC₄, LTD₄, LTE₄) besteht, die durch
 eine Reihe von Reaktionen gebildet werden einschließlich
 15 der durch 5-Lipoxygenase ausgelösten Reaktion von Arachi-
 donsäure, und deren chemische Strukturen aufgeklärt wur-
 den (Immunology and Pharmacology , Bd. 2, Nr. 2 (1984),
 S. 207 bis 213).

20 In der JP-OS 11 975/1982 ist 5-(3-n-Butyloxalylamino-
 phenyl)-tetrazol (nachstehend mit MTB bezeichnet) als
 eine Verbindung beschrieben, die eine antiallergische Wir-
 kung zeigt. Die Verbindung hat die nachstehende chemische
 Struktur:

25



30

Obwohl es danach bekannt war, daß MTB eine antiallergische
 Wirkung zeigt, wobei die Freisetzung von Histamin inhibiert
 35 wird, war es nicht bekannt, daß MTB eine ausgezeichnete in-
 hibierende Wirkung gegenüber der SRS-A-Freisetzung auf-

1 weist (Japanese Journal of Pharmacology, Bd. 32 (1982),
S. 689 bis 697).

Der Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein neues
5 Antiasthmamittel und ein Verfahren zu seiner Herstellung
zur Verfügung zu stellen.

Die Erfindung betrifft somit den in den Ansprüchen gekenn-
zeichneten Gegenstand.

10 Bei der Suche nach einem Asthmolytikum bemerkten die Erfin-
der, daß die Substanz, die die wichtigste Rolle bei der
Verstärkung der Asthmasymptome spielt, die langsam reagie-
rende Anaphylaxiesubstanz SRS-A ist, worauf in zahlreichen
15 Screeningtests eine Verbindung gesucht wurde, die wirksam
die Freisetzung von SRS-A inhibiert. Dabei wurde als wirk-
same Substanz MTB gefunden.

Die weiteren Untersuchungen betrafen eine Verbesserung der
20 pharmazeutischen Zubereitung von MTB als Medikament. Da-
bei wurde festgestellt, daß das MTB in seiner ursprüngli-
chen Pulverform sehr schlecht bei der Konfektionierung zu
handhaben ist, da es praktisch unlöslich in Wasser ist.
Darüber hinaus wurde festgestellt, daß bei dem auf
25 herkömmliche Weise konfektionierten Pulver, die
erhaltenen pharmazeutischen Zubereitungen hinsichtlich
ihrer Abbau- und Auflösungseigenschaften minderwertig sind,
was zu einer ungenügenden Bioverfügbarkeit des Wirkstoffes
führt. Zur Lösung dieser Probleme wurde das erfindungsge-
30 mäße Verfahren zur Herstellung eines MTB enthaltenden Arz-
neimittels entwickelt.

Die Erfindung betrifft somit ein Asthmamittel, das als
Wirkstoff MTB in einer die SRS-A-Freisetzung hemmenden
35 Menge enthält, ein Verfahren zur Zubereitung dieses
Asthmamittels und die Verwendung von

1 MTB als Inhibitor der SRS-A-Freisetzung.

MTB hat eine ausgezeichnete Wirkung als Inhibitor der SRS-A-Freisetzung und der Histaminfreisetzung.

5 Bei Verabfolgung an einen Asthmapatient inhibiert MTB wirksam die Freisetzung der vorstehend genannten zwei Komponenten, die Asthma verursachen und zeigt somit eine ausgezeichnete Wirkung als Asthmolytikum.

10 Die pharmazeutische Zusammensetzung der Erfindung findet im allgemeinen als Präparat zur oralen Gabe, beispielsweise als Tabletten, Granulat, Pulver oder Kapseln Verwendung; sie kann jedoch auch in Form eines Inhalats, von Suppositorien, Cataplasmen, Injektionen oder ähnlichem 15 verwendet werden.

Das Asthmamittel der Erfindung zeigt ausgezeichnete spasmyolytische Wirkung; im allgemeinen liegt eine Dosiseinheit bei etwa 10 bis etwa 500 mg, vorzugsweise bei etwa 50 20 bis etwa 300 mg für einen erwachsenen Patienten.

Die Herstellung der pharmazeutischen Zusammensetzung der Erfindung erfolgt auf herkömmliche Weise. Um jedoch die Bioverfügbarkeit des Wirkstoffs zu vergrößern erfolgt die 25 Herstellung vorzugsweise nach einem neuen Verfahren, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man a) MTB und mindestens eine Komponente, ausgewählt aus Polysorbat-80, Polyvinylpyrrolidon (nachstehend als PVP bezeichnet), mit Polyoxyäthylen gehärtetes Ricinusöl, Polyäthylenglykol (nachstehend mit PEG bezeichnet), Hydroxymethylcellulose, Hydroxypropylcellulose und Hydroxypropylmethylcellulose (die ausgewählten Komponenten werden nachstehend als das spezifische Dispergiermittel bezeichnet) zusammen mit einem nicht-wäßrigen Lösungsmittel gleichmäßig vermischt und anschließend das nicht-wäßrige Lösungsmittel aus dem Gemisch 30 entfernt, oder b) das MTB in flüssigem PEG auflöst und da-

1 mit ein den Wirkstoff enthaltendes flüssiges PEG erhält.
Nötigenfalls kann die Zubereitung mit einem pharmazeutisch
verträglichen Träger verdünnt werden. In dem Verfahren der
Erfindung kann jedes inerte Lösungsmittel verwendet werden,
5 das sowohl MTB als auch das spezifische Dispergiermittel
gleichzeitig löst oder dispergiert und das leicht wieder
abgezogen werden kann. Beispiele für geeignete Lösungs-
mittel sind Methanol, Äthanol, Isopropanol, Aceton und Di-
chlormethan. Sie können allein oder in Kombination verwen-
10 det werden.

Das spezifische Dispergiermittel ist relativ hochmolekular
und kann sowohl in Wasser als auch in einem nicht-wäßrigen
Lösungsmittel gelöst oder dispergiert werden. Obwohl die
15 Menge des verwendeten spezifischen Dispergiermittels in
Abhängigkeit von dessen Art außerordentlich schwankt,
liegt sie im allgemeinen im Bereich von 0,01 bis 10
Gewichtsteilen pro Gewichtsteil MTB.
20 PEG mit einem mittleren Molekulargewicht von etwa 200 bis
etwa 6000 wird bevorzugt verwendet.

Jeder inerte Trägerstoff ist geeignet, soweit er pharma-
zeutisch verträglich ist. Beispiele für inerte Trägerstof-
fe sind kristalline Cellulose, Maisstärke, Mannit, leichtes
25 Kieselsäureanhidrid und Kaolin.

Gemäß dem Verfahren der Erfindung wird der Wirkstoff MTB
in einem nicht-wäßrigen Lösungsmittel zusammen mit dem
30 spezifischen Dispergiermittel gelöst bzw. dispergiert,
wonach das Lösungsmittel abgezogen wird. Es hinterbleibt
eine feste Lösung oder eine Mitfällung, die das pharma-
zeutische Präparat darstellt. Bei Verwendung von flüssigem
PEC kann auch ein pharmazeutisches Präparat durch Auflösen
35 von MTB in dem PEG erhalten werden. Aufgrund seines aus-
gezeichneten Dispersions- und Auflösungsvermögens weist

1 die gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte pharmazeutische Zusammensetzung eine hohe Bioverfügbarkeit auf.

5 Messungen mit einem Differentialthermokalorimeter (DSC 30-Typ hergestellt von Shimadzu Corporation, Japan) zeigen, daß MTB einen Absorptionspeak aufweist, der eine kristalline Struktur anzeigt, wogegen das durch Vermischen von MTB mit dem spezifischen Dispersionsmittel zusammen 10 mit einem nicht-wässrigen Lösungsmittel erhältene Produkt keinen derartigen Peak aufweist. Diese Beobachtung bestätigt, daß die Behandlung mit dem nicht-wässrigen Lösungsmittel in dem erfindungsgemäßen Verfahren nicht nur den Grad des Vermischens erhöht, sondern auch eine Änderung in der 15 Kristallstruktur des MTB herbeiführt.

Gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren kann auch wahlweise zunächst eine Vormischung mit einer hohen Konzentration MTB ohne einen Trägerstoff oder mit einer begrenzten Menge 20 eines Trägerstoffes hergestellt werden und die erhaltene Vormischung anschließend mit einem Trägerstoff nach herkömmlichen Verfahren verdünnt werden, um die pharmazeutische Zubereitung in der gewünschten Form zu erhalten. Darüber hinaus kann auch eine größere Menge des spezifischen 25 Dispergiermittels verwendet werden, das auch als Trägerstoff dient.

Zur Herstellung eines körnigen oder pulverförmigen Produktes wird im allgemeinen/einem nassen Herstellungsverfahren 30 MTB gleichzeitig mit einem üblichen Träger, Bindemittel, Süßstoff und anderen Hilfsmitteln zusammen mit einem nicht wässrigen Lösungsmittel vermischt. Erforderlichenfalls wird das körnige oder pulverförmige Produkt in eine Kapsel gefüllt, oder tablettiert.

1 Selbst wenn MTB und das spezifische Dispergiermittel nicht vollständig in einem nicht-wässrigen Lösungsmittel gelöst sind, zeigt das MTB-Präparat noch ein unerwartet hohes Auflösungsvermögen.

5

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

B e i s p i e l 1

10 Ein Gemisch von 50 g MTB, 44 g kristalliner Cellulose, 10 g Maisstärke und 10 g Hydroxypropylcellulose mit einem niedrigen Substitutionsgrad wird mit 6 g PVP gelöst in 30 ml Isopropanol versetzt und das erhaltene Gemisch gleichmäßig vermischt, granuliert, bei 40°C 5 Stunden lang 15 getrocknet und gesiebt. Es wird ein feinkörniges Produkt erhalten.

B e i s p i e l 2

20 Ein feinkörniges Produkt wird auf die in Beispiel 1 beschriebene Weise erhalten, wobei anstelle von 6 g PVP 4 g PVP und 2 g Polysorbat-80 verwendet werden. Das erhaltene feinkörnige Produkt wird dann in eine Hartgelatinekapsel gefüllt.

25

B e i s p i e l 3

100 g MTB werden in 500 ml Aceton gelöst und mit 10 g Polysorbat-80 versetzt, wobei ein Gemisch erhalten wird. Nach Verrühren des Gemisches wird dieses mit 400 g kristalliner Cellulose, 50 g Hydroxypropylcellulose mit einem niedrigen Substitutionsgrad und 440 g Maisstärke versetzt, anschließend gleichmäßig vermischt, bei 50°C 5 Stunden getrocknet und gesiebt. Es wird ein pulverförmiges Produkt erhalten.

35

B e i s p i e l 4

1

Ein Gemisch von 100 g MTB, 420 g kristalliner Cellulose, 400 g Kornstärke und 30 g Hydroxypropylcellulose mit einem niedrigen Substitutionsgrad wird mit 50 g PVP, gelöst in 5 550 ml Isopropanol, versetzt. Das erhaltene Gemisch wird verknnetet und durch ein Sieb der lichten Maschenweite von 0,7 mm extrudiert, wobei ein Granulat erhalten wird, das anschließend 5 Stunden bei 50°C getrocknet und gesiebt 10 wird. Es wird ein Granulat erhalten, das 50 mg MTB pro 500 mg Produkt enthält.

B e i s p i e l 5

15

10 g MTB und 20 g Hydroxypropylmethylcellulose werden in 200 ml eines Gemisches von Dichloräthan und Äthanol (1/1) gelöst. Das erhaltene Gemisch wird mit 20 g leichtem Kieselsäureanhydrid versetzt. Das Gemisch wird gleichmäßig vermischt und durch Abdestillieren des Lösungsmittels unter verminderter Druck getrocknet, wobei ein Pulver erhalten wird. Dieses wird durch ein 40-mesh Sieb (lichte 20 Maschenweite ca. 0.37 mm) gegeben und gleichmäßig mit 50 g Mannit vermischt, wobei ein Pulver erhalten wird.

25

B e i s p i e l 6

30

100 g MTB werden in 300 ml eines Gemisches von Dichloräthan und Äthanol (1/1) gelöst und mit 3 g Polysorbat-80 versetzt. Nach dem Auflösen des Polysorbats werden 167 g kristalline Cellulose zugegeben und das Ganze gleichmäßig vermischt. Anschließend wird das erhaltene Gemisch 4 Stunden bei 50°C getrocknet, wobei ein Pulver erhalten wird, das dann gleichmäßig mit 4 g Magnesiumstearat vermischt wird. Das vermischte Pulver wird in Kapseln der Nr. 4 in einer Menge von 137 mg Pulver pro Kapsel gefüllt. Es wird 35 eine Hartgelatinekapsel erhalten, die 50 mg MTB pro Kapsel enthält.

1

B e i s p i e l 7

100 g MTB werden in 400 g PEG mit einem mittleren Molekulargewicht von 400 gelöst, wobei eine Lösung erhalten wird,
5 die mit 200 g leichtem Kieselsäureanhydrid und 300 g Calciumcarboxymethylcellulose vermischt wird. Das erhaltene Pulver wird durch ein 42-mesh Sieb (lichte Maschenweite 0,351 nm) gegeben. Es wird ein Pulver erhalten, das 50 mg MTB pro 500 mg Produkt enthält.

10

B e i s p i e l 8

Ein Gemisch von 100 g MTB, 80 g kristalliner Cellulose, 20 g Kornstärke und 16 g Hydroxypropylcellulose mit einem niedrigen Substitutionsgrad wird mit 16 g PVP und 4 g mit Polyoxyäthylen gehärtetem Ricinusöl, gelöst in 120 ml Äthanol, versetzt. Das erhaltene Gemisch wird gleichmäßig verknetet, granuliert, 4 Stunden bei 50°C getrocknet und durch ein Sieb gegeben. Zu dem erhaltenen Granulat werden 20 4 g Talcum gegeben, das Gemisch wird gleichmäßig vermischt und in Kapseln der Nr. 4 in einer Menge von 120 mg pro Kapsel abgefüllt. Es werden Hartgelatinekapseln erhalten, die 50 mg MTB pro Kapsel enthalten.

25

B e i s p i e l 9

100 g MTB und 80 g PEG mit einem mittleren Molekulargewicht von 6000 werden in 500 ml eines Gemisches von Dichlormethan und Äthanol (1/1) gelöst. Die erhaltene Lösung wird mit 20 g leichtem Kieselsäureanhydrid versetzt, gleichmäßig vermischt, 4 Stunden bei 50°C getrocknet und pulverisiert. Das erhaltene Pulver wird mit 88 g kristalliner Cellulose, 10 g Carboxymethylcellulose und 2 g Magnesiumstearat versetzt, und das erhaltene Gemisch auf herkömmliche Weise tablettiert. Die erhaltenen Tabletten enthalten 50 mg MTB pro Tablette.

1

Beispiel 10

Ein Gemisch von 100 g MTB, 80 g kristalliner Cellulose, 36 g Kornstärke und 10 g Hydroxypropylcellulose mit einem niederen Substitutionsgrad wird mit 10 g PVP und 2 g Polysorbat-80, gelöst in 120 ml Äthanol, versetzt und anschließend gleichmäßig verknnetet. Das verknnetete Gemisch wird durch ein Sieb der lichten Maschenweite 0,7 mm extrudiert und das erhaltene Granulat 5 Stunden bei 50°C getrocknet und gesiebt. Nach Zugabe von 2 g Magnesiumstearat wird das Granulat auf herkömmliche Weise tablettiert. Es werden Tabletten mit einem Durchmesser von 7 mm und einem Gewicht von 120 mg erhalten.

15

Beispiel 11

2 g MTB werden in 10 g Aceton gelöst, mit 0,2 g Polysorbat-80 versetzt und anschließend geschüttelt und vermischt. Die erhaltene Lösung wird mit 511,8 g Kaolin versetzt, 20 gleichmäßig vermischt und getrocknet, wobei ein getrocknetes Pulver erhalten wird. Hiervon getrennt werden 440 g Glycerin auf 100°C erhitzt, um darin enthaltenes Wasser zu entfernen und anschließend mit 45 g Borsäure versetzt. Zu der erhaltenen Glycerinlösung wird das vorstehend beschriebene trockene Pulver gegeben. Nach dem Abkühlen wird das Gemisch mit 0,5 g Thymol, gelöst in 0,5 g Pfefferminzöl, versetzt und das ganze Gemisch gründlich vermischt, wobei ein Cataplasma erhalten wird.

30

Das erfindungsgemäße Arzneimittel ist ein Asthmolytikum, das die Freisetzung von Histamin und von SRS-A sehr wirkungsvoll inhibiert und eine Stenosis der Luftwege (Abnahme des Atemvolumens) während eines Asthmaanfalls sehr wirksam verhindert.

- 1 Die nachstehenden Versuche erläutern die Wirkung der erfundungsgemäßen pharmazeutischen Zubereitungen.

Versuch 1

- 5 Hemmende Wirkung von MTB auf die Freisetzung von Histamin und SRS-A in Lungenabschnitten von Meerschweinchen

Männliche Hartley-Meerschweinchen werden durch intravenöse Gabe von 0,5 ml pro Kopf von anti-BSA Meerschweinchen-Blutserum passiv sensibilisiert.

10 2 Tage später werden nach dem Ausbluten und Töten der Meerschweinchen die Lungen entnommen und in Scheiben geschnitten, die mit gegebenen Konzentrationen des zu untersuchenden Wirkstoffs behandelt werden. Nach 5minütiger Behandlung wird die durch die Wirkung des Antigens freigesetzte Menge von Histamin und SRS-A gemessen und das Freisetzung-Hemmungs-Verhältnis in Prozent bezogen auf die freigesetzte Menge der Kontrollgruppe, in der keine Behandlung mit dem 15 Wirkstoff durchgeführt wurde, berechnet.

$$\text{Freisetzung-Hemmungs-Verhältnis (\%)} \\ = \frac{R_O - R}{R_O} \times 100 (\%)$$

25 R_O : Freigesetzte Menge der Kontrollgruppe
 R : Freigesetzte Menge der mit dem Wirkstoff behandelten Gruppe

30 Die eingesetzten Wirkstoffe sind der Wirkstoff der Erfahrung MTB und, als Vergleichsverbindungen, das Dinatriumsalz der Cromoglicinsäure (nachstehend als DSCG benannt) und Tranilast (nachstehend als N-5' bezeichnet). Der Versuch wurde in einem Konzentrationsbereich von 10^{-8} bis 10^{-4} g/ml durchgeführt. Das Histamin wurde durch die 35 Fluoreszenzmethode (siehe Journal of Allergy, Bd. 46 (1970), Seiten 12 - 20) und das SRS-A durch die Magnus-

1 Methode (siehe "Yakubutsugaku Jikken" (Experiments in
pharmacology), veröffentlicht von Nanzando, Japan) bestimmt.

5 Die Ergebnisse sind in Tabelle I zusammengefaßt. Jeder der
in der Tabelle wiedergegebenen Werte stellt den Durch-
schnittswert von drei Messungen dar.

Tabelle I

Konzentration des Wirkstoffs (g/ml)	Freisetzung-Hemmungs-Verhältnis - (%)					
	Histamin			SRS-A		
	MTB	DSCG	N-5'	MTB	DSCG	N-5'
10 ⁻⁴	37	2	16	64	13	54
10 ⁻⁵	30	0	5	66	9	11
10 ⁻⁶	14			49		
10 ⁻⁷	6			28		
10 ⁻⁸	8			2		
Kontrolle	0	0	0	0	0	0

20

Wie aus den in Tabelle I zusammengefaßten Ergebnissen her-
vorgeht, zeigt der erfindungsgemäße Wirkstoff MTB ein
bemerkenswert hohes Histamin- und SRS-A-Freisetzung-
Hemmungs-Verhältnis verglichen mit den für die DSCG und
25 N-5' berechneten Werten. Die Werte für das Freisetzung-
Hemmungs-Verhältnis bei SRS-A liegen für MTB mit 49 bis
66 % im Konzentrationsbereich von 10⁻⁶ bis 10⁻⁴ g/ml be-
sonders hoch.

30

Versuch 2

Hemmende Wirkung von MTB auf die Freisetzung von Histamin
und SRS-A in Lungenabschnitten von Rhesusaffen

35 Anschließend wird auf die gleiche Weise wie in Versuch 1
beschrieben die Histamin- und SRS-A-Freisetzung-Hemmungs-

- 1 Wirkung des erfindungsgemäßen Wirkstoffs MTB mit der des
bekannten Wirkstoffs DSCG verglichen.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle II zusammengefaßt. Jeder
5 der in der Tabelle wiedergegebenen Werte stellt den Durch-
schnittswert von drei Messungen dar.

Tabelle II

Konzentration des Wirkstoffs (g/ml)	Freisetzung-Hemmungs-Verhältnis (%)			
	Histamin		SRS-A	
	MTB	DSCG	MTB	DSCG
10 ⁻⁴	27	0	16	2
10 ⁻⁵	2	0	17	0
10 ⁻⁶	12		18	
10 ⁻⁷	0		0	
Kontrolle	0	0	0	0

Versuch 3

Hemmende Wirkung von MTB auf die Freisetzung von Histamin
und SRS-A in Lungenabschnitten vom Menschen

Ein makrographisch normaler Abschnitt einer Probe aus einer menschlichen Lunge, excidiert in einer Lungkrebsoperation, wird mit menschlichem Atopieblutserum auf die gleiche Weise wie in Versuch 2 beschrieben, sensibilisiert. Anschließend wird die Histamin- und SRS-A-Freisetzung- Hemmungswirkung der Wirkstoffe auf die gleiche Weise wie in Versuch 1 gemessen und berechnet.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle III zusammengefaßt. Jeder der in der Tabelle wiedergegebenen Werte stellt den Durchschnittswert von drei Messungen dar.

1

Tabelle III

5

10

15

Konzentration des Wirkstoffs (g/ml)	Freisetzung-Hemmungs-Verhältnis (%)					
	Histamin			SRS-A		
	MTB	DSCG	N-5'	MTB	DSCG	N-5'
10 ⁻⁴	27	18	31	47	39	37
10 ⁻⁵	23	13	16	47	41	32
10 ⁻⁶	23			43		
10 ⁻⁷	8		-	31		
10 ⁻⁸	0			2		
Kontrolle	0	0		0	0	0

Versuch 4Verhinderung von experimentell erzeugtem Asthma

Meerschweinchen werden mit einem anti-DNP-AS-Blutserum von
 20 Meerschweinchen passiv sensibilisiert, in eine luftdichte
 Kiste verbracht und zum Inhalieren von 2,5 mg/ml DNP-BSA
 innerhalb von 15 Sekunden ohne Narkose und ohne Einschrän-
 kung der Bewegung veranlaßt; hierbei wird experimentelles
 25 Asthma erzeugt. Die Fluktuation des Thorax der Meerschwein-
 chen wird mit einem Recorder über einen Differentialdruck-
 umwandler aufgezeichnet, um das Tidalvolumen pro Zeiteinheit
 zu messen, wobei die Abnahme des Tidalvolumens bezogen auf
 den Wert erhalten wurde, der vor der Erzeugung des Asthmas
 30 gemessen wurde.

30

Die untersuchten Wirkstoffe waren MTB und N-5', die jeweils
 oral in einer Menge von 250 mg/kg 60 Minuten vor der Er-
 zeugung des Asthmas verabreicht wurden.

35 Die Ergebnisse sind in Tabelle IV zusammengefaßt. Jeder der
 in der Tabelle wiedergegebenen Werte stellt den Durch-
 schnittswert von 7 Messungen dar.

- 17 -

1

Tabelle IV

5	Zeit (Min.)	Tidal-Volumen-Abnahme (%)		
		Kontrolle	MTB	N-5'
	0	0	0	0
	1	34	17	26
	2	48	17	24
	3	47	21	24
10	4	46	23	26
	5	42	21	23
	6	41	22	25
	8	39	21	28
	10	34	21	24
15	15	30	14	27
	20	25	19	22
	30	29	15	19

- 20 Wie aus den Ergebnissen aus Tabelle IV hervorgeht, zeigt die mit MTB behandelte Gruppe eine bemerkenswert niedrige Abnahme des Tidalvolumens verglichen mit der Kontrollgruppe, der kein Wirkstoff verabreicht wurde und der Gruppe, der der Wirkstoff N-5' verabfolgt worden war. Insbesondere
- 25 zeigt der Wirkstoff der Erfindung eine ausgezeichnete Wirkung durch Verhinderung eines raschen Absinkens des Tidalvolumens unmittelbar nach der Erzeugung des Asthmas.
- 30 In der nachstehenden Tabelle V sind die LD₅₀-Werte für MTB gemessen an Warmblütern wiedergegeben.

1

Tabelle V

		Akute Toxizität LD ₅₀ (mg/kg)				
		Verabreichungsform	i.v.	i.p.	s.c.	p.o.
Tier						
Maus	männlich		1130	1120	>4000	>4000
	weiblich		1225	1160	>4000	>4000
Ratte	männlich		1110	1430	>4000	>4000
	weiblich		1160	1430	>4000	>4000
Hund	männlich		-	-	-	>4000
	weiblich		-	-	-	>4000

15

Der Test wurde mit folgenden Tieren durchgeführt:

Maus : DDY, 20 bis 23 g Gewicht, 20 Mäuse pro Gruppe

Ratte: Wistar, 110 bis 130 g Gewicht, 10 Ratten pro Gruppe

Hund : Beagle, 8 kg Gewicht, 3 Hunde pro Gruppe.

20

Die folgenden Versuche zeigen, daß der gemäß dem erfindungsgemäß Verfahren konfektionierte Wirkstoff MTB sich durch eine ausgezeichnete Auflösungsgeschwindigkeit und Bioverfügbarkeit (Konzentration im Blut) auszeichnet.

25

Versuch 5

Auflösungstest

500 ml künstlicher Magensaft (Japanese Pharmacopoeia, die 30 erste Flüssigkeit) werden als Eluat verwendet. Der künstliche Magensaft wird in einen Behälter verbracht, bei 37 ± 0,5°C gehalten und mit dem Testpräparat versetzt, das 50 mg MTB enthält. Die Mischung wird bei 100 RpM gerührt. In Zeitabschnitten von festgesetzten Minuten wird jeweils 35 eine Probe entnommen, um die Menge des im Magensaft gelösten MTB durch Spektrophotometrie zu bestimmen.

1 Die erhaltenen Werte sind in der Tabelle VI zusammengefaßt.

Gruppe A der Erfindung in der Hart-Gelatinekapsel entspricht Beispiel 6.

5 Gruppe B der Erfindung als Tablette entspricht Beispiel 10. Vergleichsgruppe A in der Hart-Gelatinekapsel entspricht einem nach herkömmlicher Methode hergestellten Präparat. Vergleichsprobe B als Tablette entspricht einem nach herkömmlicher Weise hergestellten Präparat.

10

Tabelle VI

Zeit (Min.)	Auflösungsge- schwindigkeit (%)	Hart-Gelatinekapsel		Tablette	
		Probe A der Erfindung	Vergleichs- probe A	Probe B der Erfindung	Vergleichs- probe B
5		77.6	3.6	51.2	2.1
10		87.8	6.2	60.0	3.7
20		98.0	12.3	84.3	6.8
30		99.8	17.6	93.6	9.5
40		101.4	22.5	97.8	10.9
60		98.7	31.7	98.4	12.0

25

Wie aus der Tabelle VI hervorgeht, zeigen die Präparate der Erfindung eine hohe Auflösungsgeschwindigkeit.

Die in den vorstehenden Tests verwendeten Vergleichspräparate wurden wie folgt hergestellt.
30

Vergleichsprobe A

50 g kristallines MTB in Pulverform werden gleichmäßig mit 35 68 g Lactose und 2 g Magnesiumstearat vermischt. 120 mg des erhaltenen Gemisches werden in eine Kapsel gefüllt. Es

1 wird eine Hart-Gelatinekapsel mit 50 mg MTB erhalten.

Vergleichsprobe B

5 Ein Gemisch von 50 g kristallinem MTB in Pulverform, 40 g Lactose, 15 g Maisstärke, 10 g kristalliner Cellulose in Pulverform und 3 g Stärke als Paste wird mit etwa 40 ml Wasser verknetet und durch ein Sieb mit einem Durchmesser von 7 mm extrudiert. Das erhaltene Granulat wird getrocknet, gesiebt und mit 2 g Magnesiumstearat versetzt. Die erhaltene Mischung wird tablettiert. Es werden Tabletten mit 10 50 mg MTB pro Tablette erhalten.

Versuch 6

15 Bestimmung der MTB-Konzentration im Blut

Fünf männlichen Beagle-Hunden mit einem Gewicht von jeweils etwa 10 kg wird nach 24-stündigem Fasten ein Testpräparat oral verabreicht. In bestimmten Zeitintervallen wird den 20 Hunden Blut entnommen und die MTB-Konzentration im Blut durch Flüssigchromatographie bestimmt.

Die Testpräparate waren die gleichen wie in Versuch 5.

25 Die Ergebnisse sind in Tabelle VII zusammengefaßt.

30

35

Tabelle VII

Zeit (Min.)	Konzentration im Blut (μ g/ml)	Hartkapsel		Tablette	
		Probe A der Erfindung	Vergleichs- probe A	Probe B der Erfindung	Vergleichs- probe B
15	0.23	0.04	0.14	ND	
30	0.36	0.08	0.28	0.03	
45	0.44	0.12	0.39	0.05	
60	0.57	0.14	0.56	0.07	
90	0.62	0.30	0.64	0.13	
120	0.47	0.18	0.56	0.09	
180	0.23	0.08	0.31	0.04	
240	0.16	0.05	0.22	0.03	
360	0.09	0.03	0.10	ND	

Anm.: Die in der Tabelle wiedergegebenen Werte entsprechen
 20 dem an fünf Hunden gemessenen Durchschnittswert.
 ND bedeutet, daß MTB nicht nachgewiesen wurde.

Die vorstehenden Versuche zeigen, daß das Asthmamittel der
 25 Erfindung eine ausgezeichnete Wirkung als Inhibitor der
 SRS-A-Freisetzung aufweist.